VERSUCHE ZUR ANREICHERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES LYSOLECITHIN FREISETZENDEN ENZYMS AUS MENSCHLICHEM SERUM

ELLEN ANCKER

1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545804_0052

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München
Direktor: Prof. Dr. A. Butenandt

Versuche zur Anreicherung und Charakterisierung eines Lysolecithin freisetzenden Enzyms aus menschlichem Serum

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ellen Ancker
aus
München

1969

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:	Prof.Dr.Dr.G.Ruhenstroth-Bauer
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.Dr.A.Butenandt
Dekan:	Prof.Dr.F.Marguth
Tag der mündlichen Prüfung:	17.12.1968

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 1965 bis März 1968 im Max-Planck-Institut für Biochemie in München durchgeführt.

Herrn Professor Dr. A. Butenandt und Herrn Professor Dr. G. Ruhenstroth-Bauer danke ich für die vielseitige Förderung und Unterstützung der Arbeit.

Inhaltsübersicht

	Seite
Einleitung mit Übersicht über die bei der beschleunigten Blutkörperchensenkung beteiligten Faktoren	1
Methoden	3
Ergebnisse	20
Besprechung	42
Zusammenfassung	48
Literaturverzeichnis	49

UNIV. LEIDEN BIBL.

Versuche zur Anreicherung und Charakterisierung eines Lysolecithin freisetzenden Enzyms aus menschlichem Serum

Die beschleunigte Blutkörperchensenkung stellt eine Routinemethode der ärztlichen Diagnostik dar. Sie wurde ausführlich erst in der Mitte des 19. Jahrhunderts von Nasse (1) und Hewson (2) beschrieben. Danach geriet sie in Vergessenheit, bis sie schließlich von Fåhraeus erneut beschrieben und in die Klinik eingeführt wurde (3).

Die Blutkörperchensenkung wird verursacht durch Erythrocyten-Agglomerate, die beschleunigt sedimentieren (4). Die Agglomeration ist auf spezifische Plasmaproteine zurückzuführen, die als Agglomerine bezeichnet werden (5). Zu diesen senkungsaktiven Plasmafaktoren gehören Fibrinogen (6), Haptoglobin (7), Coeruloplasmin, 7-S-γ-Globulin und die 19-S-Makroglobulinfraktion. Ein weiteres unspezifisches Protein, das selbst keine Senkungsaktivität besitzt, ermöglicht oder steigert die Wirkung dieser Proteine (8).

Im Vergleich zu diesen Plasmafaktoren beeinflussen normal geformte Erythrocyten die Blutkörperchensenkung im wesentlichen nur hinsichtlich ihrer Konzentration (9); denn Erythrocyten von Kranken mit beschleunigter Blutkörperchensenkung zeigen mit blutgruppenverträglichem Plasma von Gesunden nurmehr normale Senkungswerte (10).

Neben den physiologisch vorkommenden senkungsaktiven Proteinen beschleunigt eine Reihe hochmolekularer Substanzen wie Pectin (11), Polyvinylpyrrolidon (12,13), Polyaminosäuren (7), Gelatine (14), Hyaluronsäure (15), Dextran (16,7) und Myosin (7), ebenfalls die Blutkörperchensenkung.

Aus menschlichen normal und beschleunigt senkenden Blutplasmen und Seren entsteht während einer mehrstündigen Inkubation bei 37° eine Substanz, die die Beschleunigung einer Blutkörperchensenkung hemmt. Bergenhem und Fåhraeus haben diese Erscheinung als erste vor mehr als 30 Jahren beobachtet und wahrscheinlich gemacht, daß der Hemmstoff mit Lysolecithin identisch ist (17).

Neuere Befunde haben diese Annahme bestätigt: Schiebel et al. haben gezeigt, daß der bei der Inkubation entstehende Senkungsinhibitor dieselben chemischen und physikalischen Eigenschaften wie Lysolecithin besitzt (18). Einen zusätzlichen Beweis haben Fischer und Ferber erbracht, die durch Acylierung der gereinigten Hemmsubstanz mit ^{14}C-markierter Ölsäure radioaktiv markiertes Lecithin synthetisieren konnten (19). Der Senkungsinhibitor entsteht aus einem in der Lipoproteidfraktion vorkommenden Proinhibitor (20,21). Nach seiner Freisetzung bindet er sich an Rezeptoren des Albumins (22,23) und der Erythrocyten (24,25). Über den Mechanismus der Inhibitorfreisetzung ist bis jetzt wenig bekannt. Eine Reihe von Beobachtungen sprechen dafür, daß die Reaktion enzymatisch vor sich geht (17,26,27). Sie kann z.B durch Schwermetallionen (27), Esteraseblocker (27) und SH-Gruppenblocker gehemmt werden.
Die beschleunigte Blutkörperchensenkung wird auch von bestimmten unveresterten Fettsäuren gehemmt, die jedoch in einer etwa 6-10fach höheren Konzentration als Lysolecithin vorliegen müssen (28). Neben diesen physiologisch vorkommenden Hemmstoffen gibt es eine Reihe niedermolekularer Substanzen, die zugleich eine antiphlogistische Wirkung besitzen wie Natriumsalicylat (29,30), Phenylbutazon (31,32), Gentisinsäure, Atophan, Indomethacin und Logantan (33), die eine ähnliche Wirkung haben.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Versuchen zur Anreicherung und Charakterisierung dieses Lysolecithin freisetzenden Enzyms aus dem menschlichem Serum.

Methoden

1. Herkunft der Substanzen und Geräte:

Substanzen:

Agarose, Antiseren: Behringwerke AG (Marburg/Lahn)
Alconox: Alconox, Inc. (New York)
Aceton, Alkohol, Äther: dest.
Ammoniak 25 %: Riedel-De-Haen AG (Seelze-Hannover)
Ammoniumsulfat (p.a.): Merck AG (Darmstadt)
Amidoschwarz 10 B (für Elektrophorese): Merck AG (Darmstadt)
$CaCl_2$, $Ca(H_2PO_4)_2$ reinst: Merck AG (Darmstadt)
Cialit: Asid-Institut GmbH (München-Lohhof)
CM-Sephadex, DEAE-Sephadex: Pharmacia (Uppsala)
Dextran (MG=96 000): Knoll AG (Ludwigshafen)
EDTA-Dinatriumsalz: Merck AG (Darmstadt)
Folin-Ciocalteus-Phenolreagens: Merck AG (Darmstadt)
Harnstoff (chem. rein): Riedel-De-Haen AG (Seelze-Hannover)
p-Hydroxymercuribenzoat (Natriumsalz): Sigma
Kaliumbromid (p.a.): Merck AG (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (Sörensen): Riedel-De-Haen AG (Seelze-Hannover)
Lecithin: Mann Research Laboratories,Inc. (New York)
2-Merkaptoäthanol (p.a.): Fluka AG, Buchs SG (Schweiz, St.Gallen)
NaCl, Na_2CO_3 (p.a.): Merck AG (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat, Natriumacetat (p.a.): Riedel-De-Haen AG (Seelze-Hannover)
Phosphorsäure 85 %-ige Lösung: Merck AG (Darmstadt)
Polyvinylchlorid (Geon X 427): Serva (Heidelberg)
Rivanol: Hoechst AG (Frankfurt)
Surfen (chem. rein): Hoechst AG (Frankfurt)
Sephadex G-25, Sephadex G-200: Pharmacia (Uppsala)
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan): Merck AG (Darmstadt)

Geräte:

Christ-Zentrifuge UJ 3 (Osterode/Harz)
Chromatographiesäulen, Punktschreiber, Uvicord: LKB-Produkter (Stockholm)
Dialyseschläuche: Visking Company (Chicago)
Elektrophoresekammer (für PVC): H. Wege (Cölbe/Lahn)
Immun-Elektrophorese-Apparatur (UGI-System): Desaga GmbH (München)
MSE-Zentrifuge (High Speed 18): MSE (London)
Spektralphotometer DU: Beckman (München)
Titan-Rotor Nr. 50, Ultrazentrifuge Spinco L50: Beckman (München)

2. Reinigung der Glasgeräte:

Die Glaswaren wurden nach dem Auswaschen etwa 12 Stunden in einer 1 %-igen Alconox-Lösung aufbewahrt, anschließend ausgespült und etwa 12 Stunden gewässert. Nach zweimaligem Durchspülen mit Aqua dest. wurden sie im Trockenschrank bei 200° getrocknet.

3. Gewinnung von Mischserum:

Nativblut von 10 klinisch gesunden Spendern beliebiger Blutgruppen wurde durch zehnminütige Zentrifugation bei 1880 g (Christ-Zentrifuge) in Serum und feste Bestandteile getrennt. Das überstehende Serum wurde abpipettiert und mit dem der anderen Spender vermischt.

4. Gewinnung einer Erythrocyten-Suspension:

Venöses Citrablut (Blut:3,8 %-iger Natriumcitratlösung = 4:1) von gesunden Spendern der Blutgruppe 0 wurde 10 Minuten bei 1880 g zentrifugiert und das überstehende Plasma mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Danach wurden die Erythrocyten dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die Erythrocyten-Suspension enthielt im Mikroliter etwa $3{,}2 \times 10^{6}$ Erythrocyten (9).

5. Die Bestimmung der Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten erfolgte nach Westergren (34):

Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit wurde nach der Methode von Westergren in genormten Senkungsansätzen bestimmt. Ein Senkungsansatz enthält 1,5 ml, davon entfällt

a) 0,7 ml auf Mischserum oder dasgleiche Volumen einer 0,9 %-igen Kochsalzlösung mit einer Serumfraktion mit oder ohne Proinhibitor.

b) 0,3 ml auf eine Dextranlösung, die 30 mg des senkungsaktiven Agens gelöst in physiologischer Kochsalzlösung enthält.

c) 0,5 ml der Erythrocyten-Suspension (s. Meth. Abs. 4).

Der Inhalt der genormten Senkungsansätze wurde in Glasröhrchen von 2,5 $\pm$ 0,1 mm Durchmesser 200 mm hoch aufgezogen. Wenn nicht anders angegeben, wurde nach 1/2-, 1- und 2-Stunden die Strecke abgelesen, die sich die Erythrocytensäule gesenkt hatte.

6. Inkubation:

Zur Inhibitorentwicklung wurde der proteinhaltige Anteil der Senkungsansätze im Brutschrank bei 37° inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug, wenn nicht anders angegeben, 7 Stunden.

7. Senkungstest:

Zur quantitativen Bestimmung der Inhibitorentwicklung wurde der Senkungsverlauf eines inkubierten Ansatzes mit dem eines identischen Kontrollansatzes verglichen. Dieser Kontrollansatz wurde anstelle der Inkubation bei 4° aufbewahrt oder nach getrennter Inkubation der aus Mischserum gewonnenen enzym- und substrathaltigen Präparate kurz vor dem Aufziehen der Senkungsansätze zusammengestellt.
Zu dem Zeitpunkt, an dem der Kontrollansatz den Senkungswert 50 mm erreicht hatte, wurde der Senkungswert des zugehörigen

Prüfansatzes abgelesen. Ein Prüfsenkungswert von 50 mm wurde als 0 % Hemmung und ein solcher von 0 mm als 100 % Hemmung gesetzt, sodaß daraus die prozentuale Hemmwirkung des im Prüfansatz vorhandenen Inhibitors berechnet werden konnte.

8. Enzymeinheit:

Als Enzymeinheit wurde jene Menge einer enzymhaltigen Proteinlösung definiert, die nach 7-stündiger Inkubation aus einer vorgegebenen Menge Substrat soviel Inhibitor freisetzt, daß die Senkungsbeschleunigung zu 50 % gehemmt ist.

9. Arbeitsbedingungen während des Präparationsganges:

Die gesamte Enzymaufarbeitung wurde bei 4^{o} durchgeführt.

10. Einengung einer Proteinlösung mittels Ultrafiltration:

Die Proteinlösung wurde über einen Tropftrichter in einen Dialyseschlauch von 10 mm Durchmesser gefüllt. Anschließend wurde der über den Auslauf des Tropftrichters gestülpte Dialyseschlauch mittels eines durchbohrten Gummikorkens so am Hals einer Saugflasche befestigt, daß die Proteinlösung von selbst in den Dialyseschlauch zulaufen konnte. Zur Herstellung des Unterdruckes wurde die Saugflasche an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen.

11. Proteinbestimmung:

Die Proteinbestimmung der verschiedenen Fraktionen wurde nach Lowry durchgeführt (35).

Reagentien:

A. 2 % Na_2CO_3 in 0,1 n NaOH

B. 0,5 % $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ in 1 % Na-Citrat-Lösung

C. 1 ml der Lösung B gemischt mit 50 ml der Lösung A

D. Folin-Ciocalteus-Reagens. Das Reagens wird mit 1 n NaOH und Phenolphthalein als Indikator titriert und die Normalität bestimmt. Zum Gebrauch wird das Reagens mit Was-

ser auf eine 1 n Lösung verdünnt. Folin-Ciocalteus-Reagens der Merck AG ist drei normal, daher wird ein Volumen Reagens mit zwei Volumen Wasser verdünnt.

Eine Proteinprobe, die 10 - 200 γ Protein enthält, wird mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1 ml aufgefüllt, mit 5 ml Lösung C versetzt und bei Raumtemperatur 10 Minuten stehen gelassen. 0,5 ml Reagens D wird hinzupipettiert und kräftig geschüttelt. Nach 30 Minuten wird die Extinktion bei 750 mμ gemessen (Beckman, Spektralphotometer DU). Der Blindwert enthält 1 ml 0,9 % Kochsalzlösung und die Reagenzien C und D.

Die Proteinkonzentration wird mittels einer Eichkurve bestimmt.

12. Ammoniumsulfatfällung von Mischserum:

Das mit physiologischer Kochsalzlösung auf einen Proteingehalt von 5 % eingestellte Mischserum wurde mit einer 3,6 M Ammoniumsulfatlösung, die mit 25 %-igem Ammoniak auf pH 7,4 gebracht worden war, so fraktioniert, daß ein Niederschlag N_1 bei 1,6 M und ein weiterer Niederschlag N_2 bei 2,4 M erhalten wurde.

Das Volumen der 3,6 M Ammoniumsulfatlösung, das zur Erreichung einer gewünschten Ammoniumsulfatsättigung zum Mischserum hinzugegeben werden mußte, wurde nach folgender Formel berechnet (36,22):

$Y = 100 (A - B) / (C - A)$

Y = Volumen der Ammoniumsulfatlösung der Sättigung C, das zu 100 ml Proteinlösung der Sättigung B gegeben werden muß, um die Sättigung A zu erhalten. Die Sättigung in Prozent wurde in molare Konzentration umgerechnet.

Die Proteinlösung wurde nach Zugabe der Ammoniumsulfatlösung 1 Stunde unter ständigem Umrühren bei 4^{o} gehalten, bevor sie durch Zentrifugation in der MSE in Niederschlag und Überstand getrennt wurde. Die Fraktionen N_1 und N_2 wurden in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und wie der

Überstand N_3 18-20 Stunden gegen isotonische Kochsalzlösung dialysiert, die 0,1 % EDTA enthielt und mit 1 n Natronlauge auf pH 7,4 gebracht worden war.
Wenn die Fraktion N_2 weiter aufgearbeitet werden sollte, wurde zum Salzaustausch statt der Dialyse die Gelfiltration über Sephadex G-25 verwendet (37).

13. Ultrazentrifugation:

Die präparative Darstellung der verschiedenen Lipoproteidfraktionen und des enzymhaltigen Unterstandes U erfolgte durch Flotation bei erhöhter Dichte in der Ultrazentrifuge (21,38,39). Als Ausgangsprodukt wurde Mischserum oder die durch Ammoniumsulfatfällung erhaltene Fraktion N_2 in einer Konzentration von 6-7 % verwendet. Aus der Fraktion N_2 wurde neben der Lipoproteidfraktion gleichzeitig der enzymhaltige Unterstand U gewonnen.

a) Lipoproteine bis zur Dichte D=1,019 g/ml (α_2-LP):

Mischserum + EDTA-Na_2 (5 mg/100 ml Mischserum) (40) + Kaliumbromid (1,914 g/100 ml Gesamtvolumen); Spinco L50; Titanrotor 50; Laufzeit 12 Stunden bei 50 000 U/min. Von der Lipoproteinschicht wurden jeweils 0,5 bis 0,7 ml abgenommen.

b) Lipoproteine zwischen den Dichten 1,019 g/ml und 1,063 g/ml (ß-LP): Nachdem die oben beschriebene Lipoproteinfraktion abgehoben war, wurden je Röhrchen 2,0-2,5 ml Zwischenzone verworfen. Der Unterstand wurde weiter verwendet: Unterstand + Kaliumbromid (6,475 g/ml Gesamtvolumen). Die Zentrifugation wurde wie oben angegeben durchgeführt. Als Lipoproteinfraktion abgehoben wurden je Röhrchen wiederum 0,5-0,7 ml.

c) Lipoproteine zwischen den Dichten 1,063 g/ml und 1,205 g/ml (α_1-LP): Nach Gewinnung der ß-Lipoproteine wurden ebenfalls 2,0-2,5 ml als Zwischenzone verworfen. Der Unterstand wurde

auf die Dichte D = 1,205 g/ml eingestellt: Unterstand + Kaliumbromid (20,896 g/100 ml Gesamtvolumen). Die Zentrifugationsbedingungen wurden, mit Ausnahme der Laufzeit (22 Std.) nicht geändert. Abgehoben wurden je Röhrchen 0,5-0,7 ml Lipoproteinfraktion.

d) Gesamtlipoproteinfraktion (GLP) bis zur Dichte D=1,205 g/ml:

Mischserum, dem EDTA-Dinatriumsalz zugesetzt war, oder N_2, das durch Dialyse oder Salzaustausch über Sephadex G-25 auf die Ausgangsdichte des Mischserums gebracht worden war, wurde auf die Dichte D=1,205 g/ml eingestellt: Mischserum bzw. N_2 + Kaliumbromid (29,285 g/100 ml Gesamtvolumen). Die Ausgangsdichte des Mischserums wurde rechnerisch mit 1,006 g/ml angenommen (41). Die Zentrifugation wurde wie unter c) angegeben durchgeführt. Als Lipoproteingesamtfraktion wurden je Röhrchen jeweils 0,6-0,8 ml abgehoben. Nach der Zentrifugation von N_2 wurden zusätzlich 2,0-3,0 ml verworfen, sodaß der Unterstand U weitgehend lipoproteinfrei war.
Die einzelnen Lipoproteinfraktionen wurden vor der Austestung 14-18 Stunden bei 4^{o} gegen eine 0,9 %-ige Kochsalzlösung dialysiert, die 0,1 % EDTA-Dinatriumsalz enthielt und mit 1 n NaOH auf pH 7,4 eingestellt worden war.
Der Unterstand U wurde nach 16-18-stündiger Dialyse gegen 0,9 %-ige, mit Natriumhydrogencarbonat gepufferte Kochsalzlösung ausgetestet. Sollte er jedoch weiter aufgearbeitet werden, wurde durch Gelfiltration über Sephadex G-25 (Säulendimension: 5,5x20,0 cm) (38) Kaliumbromid entfernt und durch den gewünschten Puffer ersetzt.

14. Gehaltsbestimmung der Lipoproteinfraktionen:

Die Gehaltsbestimmung der Lipoproteinlösungen wurde in Anlehnung an Oncley et al. (42) durchgeführt. Nach der mehrtägigen Dialyse gegen eine isotonische Kochsalzlösung wurden aliquote Volumina im Exsikkator über $CaCl_2$ getrocknet und anschließend gewogen. Das Gewicht der Salze des entsprechenden Volumens der Außenphase wurde abgezogen.

15. Chromatographie über Sephadex G-200:

Die Chromatographie der Fraktion U über Sephadex G-200 wurde in Anlehnung an Flodin und Killander (43) durchgeführt.

I. Vorbereitung des Säulenmaterials:

Trockenes Sephadex wurde zum Aufquellen mit reichlich Aqua bidest. versetzt und drei Tage bei 4^{o} aufbewahrt. Während dieser Zeit wurde mehrmals umgerührt und dekantiert, die Hauptmenge der feineren Partikel abgegossen und mit frischem Aqua bidest aufgefüllt.

II. Füllung der Säule mit Sephadex G-200:

Zum Füllen wurde das gequollene und dekantierte Gel mit 0,045 M Tris-HCl Puffer (pH 7,4), dem 0,1 M Kochsalz zugesetzt wurde, zu einem homogenen Brei aufgeschwemmt. Die Säule, deren Dimension 4,5x80 cm betrug, wurde in einem Guß völlig gefüllt. Nachdem sich das Gel einige Zentimeter abgesetzt hatte, wurde die Kapillare geöffnet und in dem Maße Gel oder Puffer nachgegossen, wie es aus der Säule tropfte. Anschließend an die Säulenfüllung wurde etwa 24 Stunden mit Puffer durchgespült.

III. Auftragung der Substanz:

Fraktion U wurde gegen 0,045 M Tris-HCl Puffer (pH 7,4), dem 0,1 M Kochsalz zugesetzt worden war, dialysiert und eingeengt. Das überstehende Elutionsmittel wurde entfernt und U mit Hilfe einer Rekordspritze mit einer Kanüle, an der ein dünner PVC-Schlauch befestigt worden war, auf das Gelbett aufgetragen. Sobald die Substanz eingesickert war, wurde mit Elutionsmittel aufgefüllt und die Säule an das Puffergefäß angeschlossen.

IV. Elution der Proteine:

Zur Elution wurde 0,045 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,4), dem 0,1 M Kochsalz zugesetzt worden war, verwendet. Die Ausflußgeschwindigkeit betrug 40 ml/Std., das Volumen der einzelnen Röhrchen 10 ml. Die Extinktion des Eluates wurde mittels Uvicord bei 254 nm gemessen.

16. Chromatographie mit dem Anionenaustauscher DEAE-Sephadex A 50:

Zur Auftrennung der Fraktion U wie F wurde in Anlehnung an Gelotte et al. (44) DEAE-Sephadex verwendet.

I. Vorbereitung des Säulenmaterials:

a) Man läßt DEAE-Sephadex in destilliertem Wasser quellen und wäscht es dann auf einem Büchner-Trichter wiederholt mit 0,5 n Natronlauge. Der Überschuß an Natronlauge wird mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Danach wird der Ionenaustauscher mit 0,5 n Salzsäure behandelt und der Überschuß an Säure wiederum mit destilliertem Wasser entfernt. Das Material wird schließlich durch Auswaschen mit 0,045 M Tris-HCl Puffer (pH 7,4) ins Gleichgewicht gebracht.

b) DEAE-Sephadex wird wie oben gewaschen. Statt mit 0,5 n Salzsäure wird der Ionenaustauscher mit 0,4 M Phosphorsäure behandelt und der Überschuß an Säure mit destilliertem Wasser entfernt. Anschließend wird das Material zur Auftrennung der Fraktion F mit 0,04 M Tris-Phosphat-Puffer (pH 8,0) ins Gleichgewicht gebracht.

II. Füllung der Säule mit DEAE-Sephadex:

Nach dem Waschen wird der Austauscher im Exsikkator evakuiert und die Suspension in das Chromatographierohr, dessen Dimension a) 2,5x25 cm und b) 1,5x15 cm beträgt, gegossen. Zum Sedimentieren wird der Säulenausfluß erst nach 5 Minuten geöffnet. Falls nötig, muß weiteres Gel eingegossen werden, um die Säule vollständig zu füllen. Danach wird sie mit dem Elutionsmittelreservoir verbunden und mit wenigstens einem Säulenvolumen des Startpuffers durchgewaschen.

III. Auftragung der Substanz:

a) Fraktion U wurde gegen 0,045 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,4), dialysiert und mit einer Pumpe automatisch auf das Säulenmaterial aufgetragen. Anschließend wurde die Säule an das Startpuffergefäß angeschlossen.

b) Fraktion F wurde gegen 0,04 M Tris-Phosphat-Puffer (pH 8,6), dialysiert und, wie in Abs. 15/III angegeben, auf das Säulenmaterial aufgetragen.

IV. Elution der Proteine:

a) Die Elution der Fraktion U wurde mit einem linearen Gradienten steigender Molarität durchgeführt. Dazu wurde in das Gefäß mit 600 ml Startpuffer Grenzpuffer geleitet, der zusätzlich zu 0,045 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,4), 0,5 M Kochsalz enthielt. Die Ausflußgeschwindigkeit betrug 36-40 ml/Std., das Volumen der einzelnen Röhrchen zwischen 9 und 10 ml. Die Proteinkonzentration wurde wie in Abs. 15/IV. ermittelt. Zusammengehörige Fraktionen wurden vereinigt, eingeengt und entweder zur weiteren Reinigung über Hydroxylapatit gegen einen 0,067 M Phosphatpuffer (pH 7,0) 16 Stunden bei 4° oder zur Austestung, wie in Abs. 15/IV. angegeben, dialysiert.

b) Die Elution der Fraktion F wurde mit einem linearen fallenden pH-Gradienten durchgeführt. In das Gefäß mit 300 ml Startpuffer (pH 8,6) wurde Grenzpuffer (pH 7,0) geleitet. Die Proteinkonzentration wurde wie in Abs. 15/III. ermittelt. Zusammengehörige Fraktionen wurden vereinigt, eingeengt und zur Austestung wie in Abs. 15/IV. angegeben, dialysiert.

17. Adsorption an Hydroxylapatit:

Die Fraktion F wurde in Anlehnung an Anacker (45) und Levin (46) über Hydroxylapatit weiter gereinigt.

I. Herstellung und Vorbereitung des Adsorptionsmittels:

In 5 l Wasser wurde 25,2 g $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$ (0,1 Mol) gelöst und unter gleichmäßigem Rühren innerhalb von 2 Stunden 1 Liter 1,5 M K_2HPO_4-Lösung sowie 1 Liter 1,4 M $CaCl_2$-Lösung gleichzeitig hinzugegeben. Nach der Sedimentation von etwa 250 g $CaHPO_4 \cdot 2\,H_2O$ wurde der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Der Nieder-

schlag wurde 3 mal mit je einem Liter Wasser auf einem Büchner-Trichter gewaschen und anschließend zur Hydrolyse des Dicalciumphosphates zu Hydroxylapatit in 2,5 l 0,05 M Natronlauge suspendiert und bei 40° unter gelegentlichem Umrühren stehengelassen. Der Überstand wurde abgesaugt, mit frischer 0,05 M Natronlauge aufgefüllt und bei 40° unter gelegentlichem Aufrühren der Suspension 24 Stunden stehengelassen; dieses Verfahren wurde 4 mal wiederholt. Anschließend wurde mittels eines Büchner-Trichters mit 0,005 M NaH_2PO_4-Lösung solange gewaschen, bis der pH des Waschwassers zwischen 6 und 7 lag.
Vor der Verwendung des so hergestellten Hydroxylapatits wurde mit 0,067 M Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen.

II. Füllung der Säule mit Hydroxylapatit:

In eine Säule, deren Dimension 3,0x15 cm betrug, wurde Hydroxylapatit in einem dünnen Brei auf einmal eingegossen. Es wurde soviel Hydroxylapatit nachgefüllt, daß die Höhe des Säulenmaterials 10 cm betrug. Anschließend wurde die Säule mit Elutionsmittel aufgefüllt und an das Pufferreservoir angeschlossen.

III. Auftragung der Substanz:

Fraktion F wurde gegen 0,067 M Phosphatpuffer (pH 7,0) dialysiert und wie in Abs. 15/III. auf Hydroxylapatit aufgetragen.

IV. Elution der Proteine:

Eluiert wurde zunächst mit 0,067 M Phosphatpuffer (pH 7,0) und die Fraktion H_1 gewonnen. Zur Gewinnung einer weiteren Fraktion wurde die Elution mit 0,3 M Phosphatpuffer (pH 7,0) fortgesetzt. Die Proteinkonzentration wurde wie in Abs. 15/IV. ermittelt. Zusammengehörige Fraktionen wurden vereinigt, eingeengt und zur Trennung mittels Polyvinylchlorid-Elektrophorese gegen einen 0,05 M Phosphatpuffer (pH 8,5) 12 Stunden oder zur Austestung, wie in Abs. 15/IV. angegeben, dialysiert.

18. Chromatographie mit dem Kationenaustauscher CM-Sephadex:

Die Fraktion F wurde über CM-Sephadex chromatographiert (47).

I. Vorbereitung des Säulenmaterials:

Die Vorbereitung von CM-Sephadex ist ähnlich wie die von DEAE-Sephadex (s. Abs. 16/Ia), wobei die Reihenfolge des Auswaschens umgekehrt ist. Dieser Austauscher wird zuerst mit 0,5 n Salzsäure und dann mit 0,5 n Natronlauge behandelt. Danach wird das Material mittels eines Büchner-Trichters mit 0,045 M Phosphatpuffer (pH 7,5) ins Gleichgewicht gebracht.

II. Füllung der Säule mit CM-Sephadex:

Das so vorbereitete Säulenmaterial wird wie in Abs. 16/II. angegeben in die Säule gefüllt.

III. Auftragung der Substanz:

Fraktion F wurde gegen 0,045 M Phosphatpuffer (pH 7,5) dialysiert und wie in Abs. 15/III. angegeben aufgetragen.

IV. Elution der Proteine:

Die Elution der Fraktion F wurde mit einem linearen Gradienten steigender Molarität durchgeführt. In das Gefäß mit 250 ml Startpuffer wurde Grenzpuffer geleitet, der zusätzlich zu 0,045 M Phosphatpuffer (pH 7,5) 0,5 M Kochsalz enthielt. Die Ausflußgeschwindigkeit betrug 32-36 ml/Std., das Volumen der einzelnen Röhrchen zwischen 8 und 9 ml. Die Proteinkonzentration wurde wie in Abs. 15/IV. ermittelt. Die gewonnene Fraktion wurde zusammengefaßt, eingeengt und zur Austestung, wie in Abs. 15/IV. angegeben, dialysiert.

19. A. Fällung mit organischen Lösungsmitteln:

Die Fällung mit Alkohol (48), Äther (49) und Aceton (50) wurde bei -10° mittels einer Kältemischung durchgeführt.

1. Die enzymhaltige Fraktion, deren Proteinkonzentration 2 % betrug, wurde mit Alkohol oder Äther so fraktioniert, daß ein Niederschlag A_1 bei 25 % (V/V) und ein weiterer Niederschlag A_2 bei 50 % (V/V) erhalten wurde. Die Fraktion A_1 und A_2 wurden in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und zur Austestung wie in Abs. 15/IV. angegeben, dialysiert.
2. Die enzymhaltige Fraktion, deren Proteinkonzentration 1 % betrug, wurde mit Aceton so gefällt, daß ein Niederschlag B_1 bei 33 % (V/V), ein Niederschlag B_2 bei 38 % (V/V) und ein Niederschlag B_3 bei 43 % (V/V) erhalten wurde. Zur Austestung wurden die Fraktionen B_1, B_2 und B_3 wie in Abs. 15/IV angegeben, dialysiert.

B. Fällung mit organischen Kationen:

1. In Anlehnung an Heide und Haupt (51) wurde eine enzymhaltige Fraktion, deren Proteinkonzentration 3 % betrug, mit einer 1 %-igen Rivanollösung (pH 7,4) bei 0,84 % (V/V) gefällt. Rivanol wurde mit festem Kaliumbromid entfernt. Der Niederschlag D_1 wurde, nachdem er in physiologischer Kochsalzlösung gelöst war, ebenso wie der Überstand D_2 zur Austestung, wie in Abs. 15/IV. angegeben, dialysiert.
2. In Anlehnung an Knedel (52) wurde eine enzymhaltige Fraktion, deren Proteinkonzentration 2 % betrug, mit einer 0,4 %-igen Surfenlösung (pH 7,4) so fraktioniert, daß ein Niederschlag S_1 bei 48 % (V/V) und ein weiterer Niederschlag S_2 bei 60 % (V/V) erhalten wurde. Zur Austestung wurden die Fraktionen S_1 und S_2, nachdem sie in physiologischer Kochsalzlösung gelöst waren, wie in Abs. 15/IV. angegeben, dialysiert.

20. Träger-Elektrophorese mittels Polyvinylchlorid:

Die präparative Elektrophorese der Fraktion H_1 mittels Polyvinylchlorid wurde in Anlehnung an Heimburger und Schmidtberger (53) durchgeführt.

I. Vorbereitung des Trägermaterials:

Das Kunststoffpulver Polyvinylchlorid wurde über einer Glasfritte (G_2) zunächst mit Wasser ausgewaschen bis die Waschflüssigkeit klar erschien. Danach wurde mit Phosphatpuffer (pH 8,5, μ=0,05) nachgewaschen. Das ausgewaschene PVC wurde mit Pufferlösung zu einer pastenartigen Konsistenz angerührt.

II. Beschicken der Elektrophoresekammer mit PVC:

Das so vorbereitete Polyvinylchlorid wurde in die kühlbare Elektrophoresekammer, deren Dimension 75x43 cm betrug, bis zu einer 1 cm hohen Schicht eingefüllt und die Oberfläche glattgestrichen.

III. Einbringen der Substanz:

Die zu trennende Fraktion H_1 wurde mit gekühltem, pulverförmigen PVC angerührt. Danach wurde diese Paste in den Startschlitz eingebracht, der sich in der Nähe der Kathode befindet und eine quer zur Kammer verlaufende Rinne (1 cm) darstellt. Zur Verhinderung der Diffusion des Materials in die Umgebung wurden Cellophanstreifen an die Wände des Startschlitzes gelegt, die nach der Einbringung der Substanz vorsichtig entfernt wurden.

IV. Elektrophoretische Trennung:

Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 160 Volt bei einer Ionenstärke des Puffers von 0,05. Die Stromstärke betrug 110 mA. Der Trennvorgang dauerte 20 Stunden.

V. Wiedergewinnung der Fraktionen:

Durch kurzzeitiges Auflegen von Filterpapierstreifen auf die Oberfläche des PVC und nachfolgende Färbung mit Amidoschwarz kann der Trennvorgang kontrolliert werden. Bei ausreichender Trennung wurden die georteten Zonen mit einem Spatel ausgehoben und die einzelnen PVC-Abschnitte über einer Glasfritte (G_2) ausgewaschen, wobei als Elutionsmittel physiologische Kochsalzlösung benutzt wurde. Die so gewonnenen Fraktionen wurden eingeengt und zur Austestung, wie in Abs. 15/IV. angegeben, dialysiert.

21. Immunelektrophorese:

Die Protein- und Lipoproteinfraktionen wurden mittels Immunelektrophorese (Semimakromethode, Desaga) charakterisiert (21,54,55).

Reagentien:

a) Puffer: aa) Stammlösung pH 8,6: 117,68 g Natrium-Veronal und 77,68 g Natriumacetat·$3H_2O$ wurden in 1 Liter Aqua bidest gelöst. Zugesetzt wurden außerdem 100 mg Cialit als Baktericidicum.

bb) Stammpuffer: Zu 100 ml Stammlösung wurden 780 ml Aqua bidest und 140 ml n/10 HCl zugegeben.

cc) Puffer zur Kammerfüllung: 1020 ml Stammpuffer und 510 ml Aqua bidest wurden zusammengegeben.

dd) Puffer zur Herstellung der Agaroselösung: Stammpuffer und Aqua bidest wurden im Verhältnis 1:2 gemischt.

b) Agarose: 1,5 g Agarose wurde mit 100 ml Puffer in siedendem Wasserbad solange erhitzt, bis alle Luftblasen hochgestiegen waren.

c) Antigenfraktionen: 0,01 - 0,02 ml Mischserum, N_2, U, F, H_1 und ferner Lipoproteine.

d) Antiseren: Antihumanserum von Kaninchen.

e) Färbung der Präzipitatlinien: Zum Färben wurde eine 0,3 %-ige alkoholische Amidoschwarzlösung benutzt (0,3 g Amidoschwarz, 5 g Trichloressigsäure, 75 ml Äthanol, 25 ml 1 %-ige Essigsäure). Die Differenzierung erfolgte mit 1 %-iger Essigsäure in 70 %-igem Alkohol.

Methode:

Ausgießen der Agarose in die Geltrennkammer:

Die seitlichen Verbindungsschlitze der Geltrennkammer wurden von unten mit Tesafilm zugeklebt. Auf eine Glastrennplatte (9x12 cm) wurde die gießfertige Agarose (60-80 ml) unter leichtem Andrücken der Glasplatte eingegossen, wobei Luftblasen zwischen Glas und Trennkammer entfernt wurden. Nach Erstarren des Gels wurde das Klebeband entfernt und das Gel war stanzfertig.

Stanzen des Gels:

Die mit Agarose ausgegossene Trennkammer wurde in die Stanzbox eingeführt und das Gel mit der gewählten Lochstanze mittels einer Stanzplatte ausgestanzt. Zum Ausstanzen der Längsrillen wurde die Stanzplatte nach unten gedrückt und das ausgestanzte Gel mit einem Spatel entfernt.

Einbringen der Proben:

0,01-0,02 ml der Antigene wurden mit einer Kapillare in die ausgestanzten Löcher gegeben.

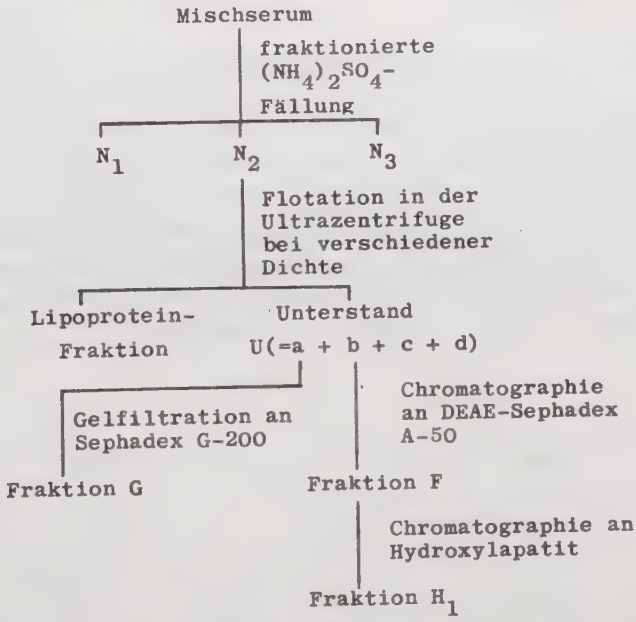
Elektrophoretische Auftrennung:

Nach Einbringen der Proben wurden die Geltrennkammern auf den Kühlblock in die Pufferbehälter eingesetzt. Auf dem Netzspeisegerät wurde die gewünschte Auftrennzeit (1 Std.) und die Spannung (10 V/cm) eingestellt. Nach Abschluß der elektrophoretischen Trennung wurden die Immunseren in die Längsrillen eingebracht. Die Geldiffusion in einer feuchten Kammer dauerte 24-36 Stunden. Danach wurde überschüssiges Immunserum entfernt und die Geltrennkammer wurde 12 Stunden in physiologischer Kochsalzlösung gewässert.

Färben der Immunelektrophoresen:

Die Glasplatte wurde 15-20 Minuten mit 0,3 %-iger alkoholischer Amidoschwarzlösung angefärbt und anschließend mit 1 %-iger Essigsäure in 70 %-igem Alkohol differenziert.

22. Schema des Präparationsganges:



Schema zur Anreicherung der Inhibitor freisetzenden Enzymaktivität aus Mischserum. Fraktion F wurde gebildet aus den Fraktionen F_3 - F_7 (Abb. 10), die eine mehr als 15 %-ige Hemmung zeigten.

Ergebnisse

Die folgenden Versuche stellen Beispiele aus mindestens je vier gleichartigen Ansätzen dar, die im Ergebnis weitgehend übereinstimmen.

1. Einfluß der Inkubationsdauer auf die Inhibitorentwicklung

Proben eines Mischserums, dem Cialit (1:10 000) als Bakteriozidicum zugesetzt worden war, wurden verschieden lange inkubiert bzw. als Kontrollen bei 4^{o} aufbewahrt. Abb. 1 zeigt, daß mit zunehmender Inkubationsdauer vermehrt Inhibitor entsteht. Da die Senkungsbeschleunigung nach 7-stündiger Inkubation zu 100 % gehemmt ist, wurde bei den nachfolgenden Versuchen diese Inkubationszeit zugrundegelegt.

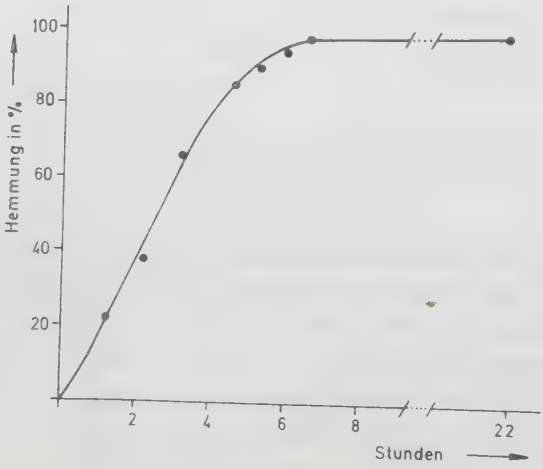


Abb. 1. Inhibitorentwicklung im Mischserum in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (s. Methoden, Abs. 3-7). Suspensionslösung: 0,7 ml Mischserum + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran.

2. Einfluß der Konzentration des Mischserums auf die Inhibitorfreisetzung

Aus Mischserum, dessen Proteinkonzentration 7,2 % betrug, wurden Proben von 0,1, 0,2, 0,3 und 0,4 ml mit physiologischer Kochsalzlösung auf 0,7 ml aufgefüllt und inkubiert. Abb. 2 zeigt, daß die Inhibitorfreisetzung bei gleicher Inkubationsdauer von der Konzentration des eingesetzten Mischserums abhängig ist. Durchschnittlich waren 32 mg Protein nötig, um die Senkung dem Kontrollansatz gegenüber um 50 % zu hemmen (s. Methoden, Abs. 2).

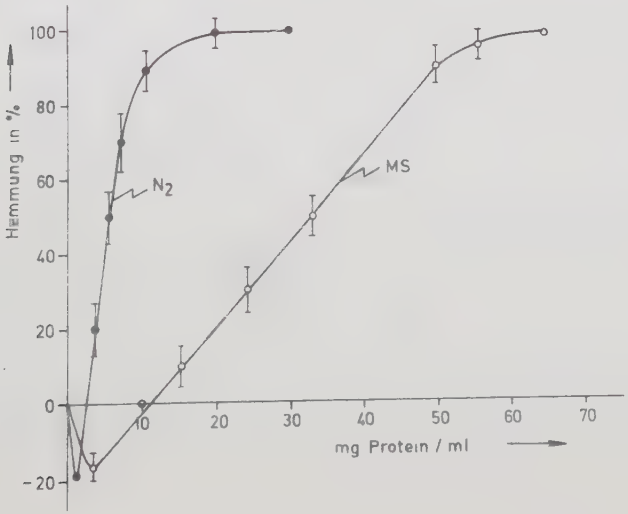


Abb. 2. Vergleich der Konzentration des Proinhibitor-Enzym-Systems im Mischserum (MS) und in N_2. Mischserum und N_2 in steigender Konzentration in 0,7 ml 0,9 %-iger Kochsalzlösung + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran. Abszisse Proteinkonzentration.

3. Einfluß von Harnstoff auf die Inhibitorentwicklung

Mischserum wurde mit Harnstoff bis 2 bzw. 4 Mol/l versetzt und in jeweils 4 Proben unterteilt. 4 weitere Proben wurden dem harnstoffreien Ausgangsserum entnommen. Nachdem von jeder Vierergruppe eine Probe inkubiert und eine als Kontrolle bei 4^{o} aufbewahrt worden war, wurden sie gemeinsam bei 4^{o} 16 Stunden gegen eine isotonische, mit Natriumhydrogencarbonat (pH 7,4) gepufferte Kochsalzlösung dialysiert. Die beiden übrigen Proben einer Gruppe wurden ebenso behandelt, wobei jedoch die Dialyse vor der Inkubation durchgeführt wurde. Ein Verlust an Inhibitor tritt im Verlauf der Dialyse nicht ein, da dieser nicht dialysabel ist (20). Abb. 3 zeigt, daß die Inhibitorfreisetzung durch Harnstoff während der Inkubation blockiert wird, diese Blockade aber reversibel ist, da das Proinhibitor-Enzym-System nahezu seine ursprüngliche Funktionsfähigkeit wieder erreicht, wenn der Harnstoff vor der Inkubation aus dem Mischserum entfernt wird.

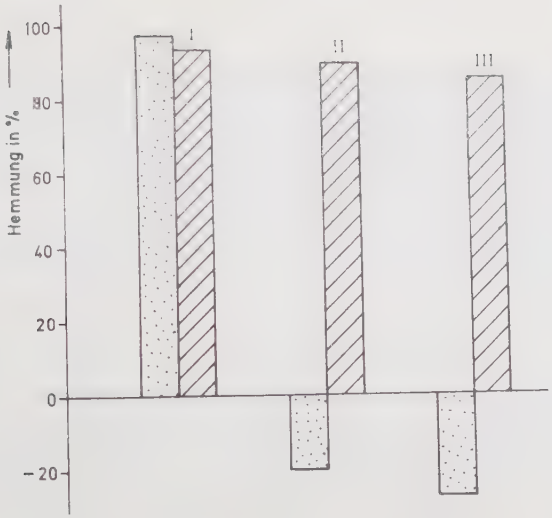


Abb. 3. Der Einfluß von Harnstoff auf die Inhibitorentwicklung bei der Inkubation von Mischserum (s. Methoden, Abs. 3-7). Suspensionslösung: 0,7 ml harnstoffbehandeltes bzw. harnstofffreies Mischserum gleicher Proteinkonzentration + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran. I = Kontrollwerte (ohne Harnstoffzusatz); II = 2 M Harnstoff; III = 4 M Harnstoff. Punktierte Säulen: Dialyse gegen harnstoffreies Medium nach der Inkubation. Schraffierte Säulen: Dialyse gegen harnstofffreies Medium vor der Inkubation.

4. Einfluß von p-Hydroxymercuri-benzoat und Mercaptoäthanol auf die Inhibitorentwicklung

p-Hydroxymercuri-benzoat wurde Mischserum in einer Endkonzentration von 0,25, 0,5, 1,0 und 2,0 µMol/ml zugesetzt. Dieses und das p-Hydroxymercuri-benzoat-freie Serum wurde in jeweils 4 Proben unterteilt. Während die ersten Proben inkubiert wur-

den, standen die zweiten als Kontrollen bei 4°; die dritten und die vierten Proben wurden nach Zusatz von Mercaptoäthanol bis 10 µMol/ml ebenso behandelt. Abb. 4 zeigt, daß die Inhbitorfreisetzung durch p-Hydroxymercuri-benzoat bereits in einer Konzentration von 0,5 µMol/ml stark gehemmt wird. Die Hemmung ist jedoch reversibel. Sie kann durch Mercaptoäthanol aufgehoben werden.

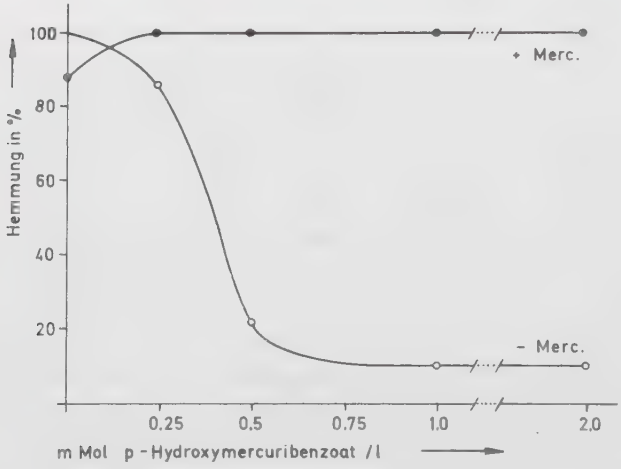


Abb. 4. Hemmung der Inhibitorentwicklung durch p-Hydroxymercuri-benzoat und Aufhebung dieser Hemmung durch Mercaptoäthanol (s. Methoden, Abs. 3-7). Die Ansätze enthielten 0,7 ml Mischserum mit steigender p-Hydroxymercuri-benzoat-Konzentration (Abszisse), 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran sowie 10 µMol Mercaptoäthanol in einem Teil der Ansätze (.▪▪.), die übrigen (o--o) enthielten kein Mercaptoäthanol.

5. Einfluß des pH-Wertes auf die Inhibitorentwicklung

Zum Nachweis der pH-Abhängigkeit der Inhibitorentstehung wurden Proben eines Mischserums vor der Inkubation mit 0,15 M Essigsäure bzw. 0,15 M Trislösung auf verschiedene pH-Werte gebracht. Zur Einstellung von pH 10,0 wurde zusätzlich zu Tris 0,1 n NaOH verwendet. Die Proteinkonzentration wurde konstant gehalten. Von allen Proben wurde eine Hälfte inkubiert, während die andere als Kontrolle bei 4^{o} stand. Anschließend wurde bei 4^{o} gegen isotonische, mit Natriumhydrogencarbonat gepufferte Kochsalzlösung dialysiert, die im Verlauf von 20 Stunden viermal gewechselt wurde. Abb. 5 zeigt, daß die Inhibitorfreisetzung in einem relativ breiten pH-Bereich möglich ist. Das pH-Optimum liegt im schwach alkalischen Bereich.

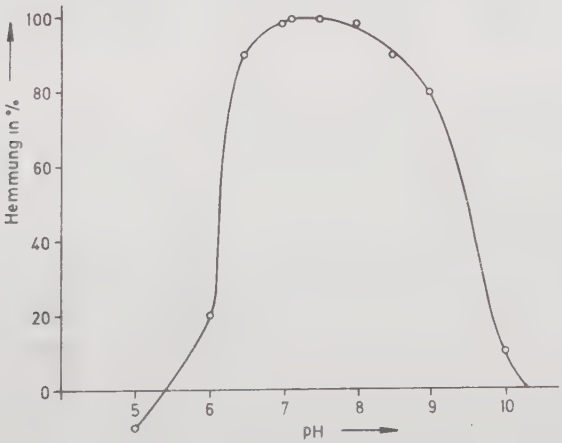


Abb. 5. Abhängigkeit der Inhibitorentwicklung vom pH-Wert des inkubierten Mischserums (s. Methoden, Abs. 3-7). Suspensionslösung: 0,7 ml pH-korrigiertes Mischserum + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran.

6. Temperaturabhängigkeit der Inhibitorfreisetzung

Zum Nachweis der Temperaturempfindlichkeit des inhibitorfreisetzenden Enzyms wurden Proben der mittels Ammoniumsulfatfällung, Ultrazentrifugation und Chromatographie über DEAE-Sephadex gewonnenen Serumfraktion F (s. Methoden, Abs. 12, 13 d, 16), in der das Enzym stark angereichert vorliegt, für 10 Min. im Wasserbad auf Temperaturen zwischen 45 und 60° erhitzt. Eine weitere Probe wurde ständig bei 4° gehalten. Um die enzymatische Aktivität dieser Proben, die jeweils 3 mg Protein enthielten, zu prüfen, wurden sie nach Proinhibitorzusatz inkubiert und im Senkungstest mit Kontrollansätzen verglichen, bei denen das enzym- und das substrathaltige Präparat getrennt inkubiert worden waren (s.Methoden, Abs. 7). Abb. 6 zeigt, daß die Inhibitorfreisetzung verhindert wird, wenn das enzymhaltige Präparat F vor der Inkubation mit dem Proinhibitor 10 Min. auf 57° oder darüber erhitzt wird.

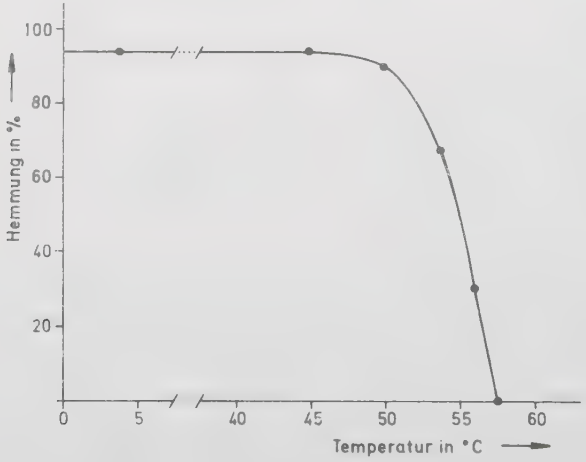


Abb. 6. Hitzeinaktivierung des enzymhaltigen Präparates F. Suspensionslösung: 3 mg F in 0,67 ml 0,9 proz., mit Natriumhydrogencarbonat (pH 7,4) gepufferter Kochsalzlösung + 0,03 ml Lipoproteinlösung (4-6 %) + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran.

7. Ammoniumsulfatfällung von Mischserum

Zur Anreicherung des Proinhibitor-Enzym-Systems wurde Mischserum mit Ammoniumsulfat gefällt (s. Methoden, Abs. 12). Die erhaltenen Fraktionen N_1, N_2 und N_3 wurden mittels Senkungstest auf ihren Proinhibitor-Enzym-Gehalt untersucht.
In Tab. 1 sind die Senkungswerte zusammengestellt, die sich nach Inkubation der oben angeführten Fraktionen gegenüber den nichtinkubierten Kontrollen ergaben. Das Proinhibitor-Enzym-System wurde nur in N_2 angereichert.

Fraktion (18 mg)	Inkubation	1-Stunden-Senkungswert (mm)	2-Stunden-Senkungswert (mm)
N_1	+	40	78
N_1	-	44	83
N_2	+	0	0
N_2	-	69	110
N_3	+	28	60
N_3	-	35	70

Tab. 1. Anreicherung des Proinhibitor-Enzym-Systems durch Ammoniumsulfatfällung. Suspensionslösung: 18 mg N_1, N_2 oder N_3 in 0,7 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran.

Nach Zugabe von Proinhibitor (0,03 ml Gesamtlipoproteinfraktion, 3-5 %) zu N_1 und N_3 und nachfolgender Inkubation konnte in diesen Fraktionen keine Inhibitorfreisetzung beobachtet

werden. Damit ist das Vorhandensein von Enzym in diesen Fraktionen ausgeschlossen.

Fraktion (40 mg)	Inkubation mit (+) und ohne (-) LP	1-Stunden-Senkungswert (mm)	2-Stunden-Senkungswert (mm)
N_1	+	55	92
N_1	-	62	103
N_3	+	9	24
N_3	-	7	24

Tab. 2. Anreicherung des Proinhibitor-Enzym-Systems durch Ammoniumsulfatfällung. Suspensionslösung: 40 mg N_1 oder N_3 in 0,67 ml 0,9 %-iger Kochsalzlösung + 0,03 ml Lipoproteinfraktion (4-5 %) + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran.

Abb. 2 zeigt die Anreicherung des Proinhibitor-Enzym-Systems in N_2 gegenüber Mischserum. Die Austestung der spezifischen enzymatischen Aktivität ergab, daß durchschnittlich etwa 6 mg N_2 nötig waren, um die Senkung dem Kontrollansatz gegenüber zu 50 % zu hemmen. Damit ist die spezifische enzymatische Aktivität gegenüber Mischserum etwa 6fach gesteigert.

8. Ultrazentrifugation von N_2

Der Proinhibitor gehört zur Lipoproteinfraktion. Durch Flotation bei erhöhter Dichte können diese angereichert werden (20). Um aus Fraktion N_2, die den Proinhibitor und das Enzym enthält, den Proinhibitor zu entfernen, wurde diese auf die Dichte D = 1,205 g/ml eingestellt und ultrazentrifugiert (s. Methoden, Abs. 13 d). Es sollte gleichzeitig geprüft werden, ob der gewonnene Unterstand U Enzym enthält. Dazu wurde die Lipoproteinfraktion LP, die Zwischenzone ZZ und der Unterstand U inkubiert und im Senkungstest mit entsprechenden bei 4^{o} aufbewahrten Kontrollansätzen verglichen.

Fraktion	Inkubation	1/2-, 1 Std. Senkungswert (mm)	50 mm-Wert (mm)	Hemmung (%)
LP (1,5 mg)	+	52 / 98	48	4
LP (1,5 mg)	-	55 / 105	50	-
ZZ (1 mg)	+	8 / 29	9	82
ZZ (1 mg)	-	46 / 102	50	-
U (12 mg)	+	45 / 106	52	-
U (12 mg)	-	40 / 104	50	-

Tab. 3. Trennung des Proinhibitor-Enzym-Systems mittels Ultrazentrifugation. Suspensionslösung: Lipoproteinfraktion LP, Zwischenzone ZZ oder der Unterstand U in den angegebenen Mengen in 0,7 ml 0,9 %-iger Kochsalzlösung + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran.

Tab. 3 zeigt, daß weder der Lipoproteinanteil LP noch der Unterstand U das gesamte Hemmsystem besitzen, während die Zwischenzone ZZ dieses, bezogen auf die geringe Proteinkonzentration, sogar angereichert enthält. Da eine Reinigung des Enzyms eine Trennung des Proinhibitor-Enzym-Systems vorraussetzt, muß es jedoch verworfen werden, auch wenn damit ein erheblicher Enzymverlust verbunden ist.
Um zu prüfen, ob der Unterstand U enzymatisch aktiv ist, wurde die gewonnene Lipoproteinfraktion LP und der Unterstand U nach gemeinsamer und getrennter Inkubation ausgetestet. Die starke Inhibitorfreisetzung in der Zwischenzone ZZ ließ den Verdacht aufkommen, daß zwischen Enzym und Substrat eine beträchtliche Affinität besteht. Dies hätte zur Folge, daß die enzymatische Aktivität im Zentrifugenröhrchen nicht gleichmäßig verteilt wäre. Deswegen wurde nach der Entfernung der Lipoproteinfraktion LP und der Zwischenzone ZZ der Unterstand U von oben nach unten in 4 Fraktionen von jeweils 2 ml (a, b, c und d) unterteilt. Diese Fraktionen wurden wie der Unter-

stand U nach gemeinsamer und getrennter Inkubation mit Lipoproteinen auf ihre Inhibitorfreisetzung untersucht.

Fraktion	Inkubation mit (+) und ohen (-) LP	1/2-, 1 Std. Senkungswert (mm)	50 mm-Wert (mm)	Hemmung (%)
U (12 mg)	+	21 / 47	20	60
U (12 mg)	-	56 / 100	50	-
a (4 mg)	+	6 / 23	8	84
a (4 mg)	-	45 / 100	50	-
b (4 mg)	+	32 / 73	32	36
b (4 mg)	-	50 / 106	50	-
c (4 mg)	+	35 / 73	34	32
c (4 mg)	-	55 / 110	50	-
d (4 mg)	+	37 / 78	41	18
d (4 mg)	-	46 / 103	50	-

Tab. 4. Nachweis der enzymatischen Aktivität im Unterstand U und Verteilung der enzymatischen Aktivität im Zentrifugenröhrchen. Suspensionslösung: Unterstand U bzw. Fraktionen a, b, c oder d in den angegebenen Mengen in 0,67 ml 0,9 %-iger Kochsalzlösung + 0,03 ml Lipoproteinfraktion (4-5 %) + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran.

Tab. 4 zeigt, daß bei gemeinsamer Inkubation der Fraktion U mit Lipoproteinen Inhibitor freigesetzt wird, während die getrennte Inkubation ohne Wirkung bleibt. Wie die enzymatische Aktivität nach Ultrazentrifugation von N_2 im Zentrifugenröhrchen verteilt ist, geht ebenfalls aus Tab. 4 und aus Abb. 7 hervor. Von den Fraktionen a - d weist die Fraktion a bei geringster Proteinkonzentration, aber die höchste spezifische Aktivität auf. Sie nimmt von oben nach unter deutlich ab und ist in der Fraktion d am geringsten.

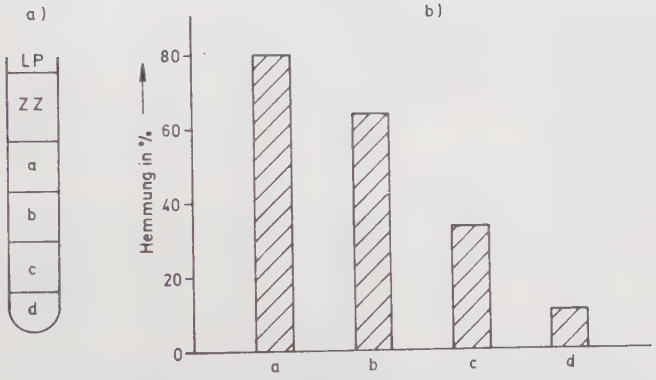


Abb. 7. a) Schema zur Gewinnung der lipoproteinfreien enzymhaltigen Fraktionen a, b, c und d.
b) Verteilung der spezifischen enzymatischen Aktivität im Zentrifugenröhrchen. Suspensionslösung: 4 mg Protein der Fraktionen a, b, c oder d in 0,67 ml 0,9 %-iger Kochsalzlösung + 0,03 ml Lipoproteinfraktion (4-5 %) + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran.

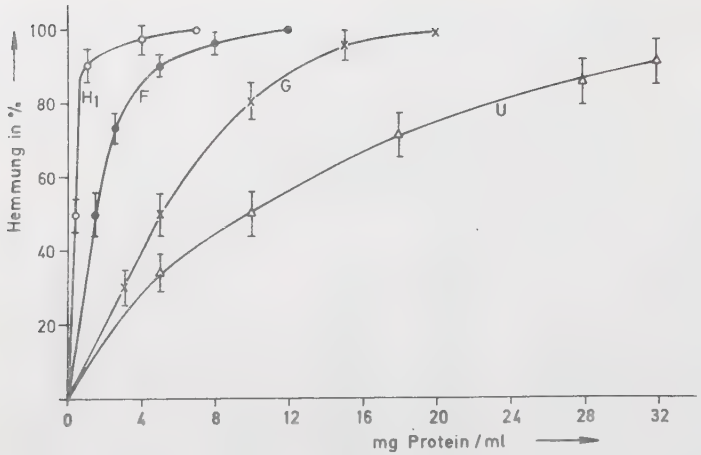


Abb. 8. Inhibitorfreisetzung aus dem Lipoproteinpräparat durch die Fraktion U, G (s. Versuch9), F (s. Versuch 10) und H_1 (s. Versuch 11). Suspensionslösung: U, G, F, bzw. H_1 in steigender Konzentration in 0,67 ml 0,9 %-iger Kochsalzlösung + 0,03 ml Lipoproteinfraktion (4-5 %) + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran.

Mehrere Versuche ergaben, daß durchschnittlich etwa 10 mg Unterstand U nötig waren, um unter Normalbedingungen die Senkung dem Kontrollansatz gegenüber um 50 % zu hemmen (s. Abb. 8).

9. Gelfiltration der Fraktion U über Sephadex G-200

Die enzymhaltige Fraktion U wurde über Sephadex G-200 aufgetrennt (s. Methoden, Abs. 15). Der Inhalt von jeweils 4 aufeinanderfolgenden Röhrchen wurde vereinigt, eingeengt und dialysiert. Von diesen so erhaltenen Fraktionen wurden jeweils 8 mg Protein nach gemeinsamer und getrennter Inkubation mit Lipoproteinen auf ihre enzymatische Aktivität ausgetestet. Abb. 9 zeigt die Verteilung der enzymatischen Aktivität innerhalb des Chromatogramms.

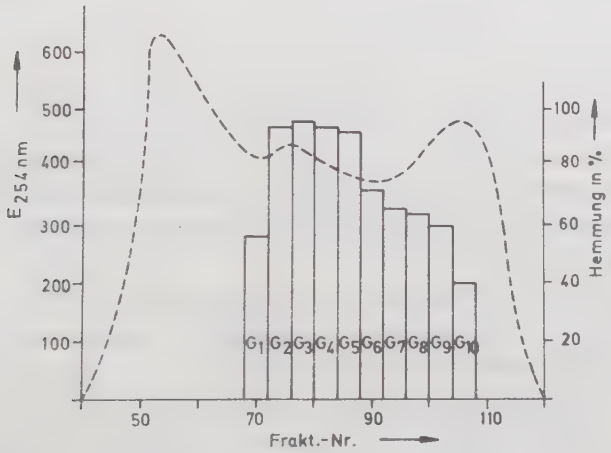


Abb. 9. Verteilung der spezifischen enzymatischen Aktivität nach Chromatographie der Fraktion U über Sephadex G-200. Suspensionslösung: 8 mg G_1, G_2 usw. in 0,67 ml 0,9 %-iger Kochsalzlösung + 0,03 ml Lipoproteinfraktion (4-5 %) + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran. Aufgetragene Menge U: 2,5 g; Ausflußgeschwindigkeit: 1,9 ml · Std.$^{-1}$ · cm^{-2}; jede Fraktion enthielt 7,5 ml.

Bei weiteren Versuchen wurde das gesamte enzymhaltige Eluat nach der Einengung auf seine spezifische enzymatische Aktivität untersucht. Es zeigte sich, daß von dieser Fraktion G durchschnittlich etwa 5,0 mg Protein nötig waren, um die Senkung dem Kontrollansatz gegenüber zu 50 % zu hemmen. Damit ist gegenüber der Fraktion U das Enzym etwa 2fach angereichert (s. Abb. 8).

10. Auftrennung der Fraktion U über DEAE-Sephadex

Wegen der verhältnismäßig geringen Anreicherung der enzymatischen Aktivität bei der Gelfiltration wurde die Fraktion U über DEAE-Sephadex A-50 aufgetrennt (s. Methoden, Abs. 16). Auch hier wurde der Inhalt von 4 Röhrchen zusammengefaßt, eingeengt und dialysiert. Von jeder Fraktion wurden jeweils 2 mg Protein mit und ohne Lipoproteinzusatz inkubiert und im Senkungstest auf ihre enzymatische Aktivität untersucht. Abb. 10 zeigt die Verteilung der enzymatischen Aktivität innerhalb des Chromatogramms.

Wenn bei den folgenden Versuchen das enzymhaltige Eluat aus den Fraktionen F_1-F_5 eingeengt und ausgetestet wurde, setzten unter Standardbedingungen durchschnittlich 1,5 mg Protein dieser Fraktion F soviel Inhibitor frei, daß eine 50 %-ige Senkungshemmung erreicht wurde. Dies entspricht einer 6fachen Anreicherung der spezifischen enzymatischen Aktivität in der Fraktion F gegenüber der Fraktion U (Abb. 8) und einer 15-20 fachen Anreicherung gegenüber dem Mischserum (Abb. 2).

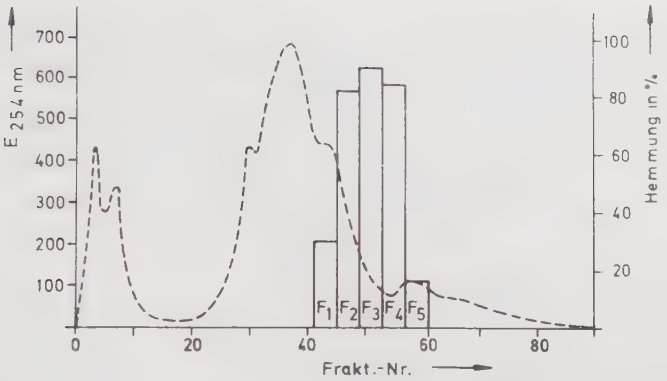


Abb. 10. Verteilung der spezifischen enzymatischen Aktivität nach Chromatographie der Fraktion U über DEAE-Sephadex A-50. Suspensionslösung: 2 mg F_1, F_2, F_3, usw. in 0,67 ml 0,9 %-iger Kochsalzlösung + 0,03 ml Lipoproteinfraktion (4-5 %) + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran. Aufgetragene Menge U: 2,8 g; Ausflußgeschwindigkeit: 7,8 ml · Std.$^{-1}$ · cm^{-2}; jede Fraktion enthielt 9,5 ml.

11. Auftrennung der Fraktion F über Hydroxylapatit

Die enzymhaltige Fraktion F wurde über Hydroxylapatit weitergereinigt (s. Methoden, Abs. 17). Die beiden bei der Auftrennung gewonnenen Fraktionen H_1 und H_2 wurden nach gemeinsamer und getrennter Inkubation mit Lipoproteinen auf ihre enzymatische Aktivität untersucht.

Fraktion (5 mg)	Inkubation mit (+) und ohne (-) LP	1-, 2 Stunden Senkungswert (mm)	Hemmung (%)
H_1	+	2 / 5	94
H_1	-	28 / 56	-
H_2	+	40 / 99	-
H_2	-	40 /102	-

Tab. 5. Auftrennung der enzymatischen Fraktion F über Hydroxylapatit und Anreicherung der enzymatischen Aktivität in der Fraktion H_1. Suspensionslösung: 5 mg H_1 oder H_2 in 0,67 ml 0,9 %-iger Kochsalzlösung + 0,03 ml Lipoproteinfraktion (4-5 %) + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran.

Während in der Fraktion H_2 keine enzymatische Aktivität gefunden wurde, reichten weniger als 200 µg Protein der Fraktion H_1 aus, um unter Standardbedingungen Inhibitor für eine 50 %-ige Hemmung freizusetzen (Abb. 8). Damit ist die spezifische enzymatische Aktivität gegenüber der Fraktion F 7fach und gegenüber dem Mischserum etwa 160fach angereichert.

12. Weitere Anreicherungsversuche

Verschiedene Methoden wurden verwendet, um das Enzym weiter anzureichern. Das Ergebnis war in keinem Fall zufriedenstellend. Häufig war eine weitgehende oder völlige Inaktivierung des Enzyms die Folge.

a. Rechromatographie der Fraktion F über DEAE-Sephadex

Die enzymhaltige Fraktion F wurde über DEAE-Sephadex rechromatographiert (s. Methoden, Abs. 16). Die bei der Auftrennung mit einem fallenden pH-Gradienten gewonnenen Fraktionen R_1,

R_2 und R_3 wurden nach gemeinsamer und getrennter Inkubation mit Lipoproteinen auf ihre Inhibitorfreisetzung untersucht.

Fraktion (4 mg)	Inkubation mit (+) und ohne (-) LP	1-, 2 Stunden Senkungswert (mm)	Hemmung (%)
R_1	+	12 / 26	64
R_1	-	36 / 63	-
R_2	+	7 / 13	70
R_2	-	21 / 40	-
R_3	+	28 / 50	44
R_3	-	50 / 82	-

Tab. 6. Rechromatographie der Fraktion F über DEAE-Sephadex. Suspensionslösung: 4 mg R_1, R_2 oder R_3 in 0,67 ml 0,9 %-iger Kochsalzlösung + 0,03 ml Lipoproteinfraktion (4-5 %) + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran.

Tab. 6 zeigt, daß die enzymatische Aktivität in allen Fraktionen vorhanden war. Es konnte also mittels Rechromatographie über DEAE-Sephadex keine Anreicherung des Enzyms erzielt werden.

b. Chromatographie der Fraktion F über CM-Sephadex

Bei der Chromatographie der Fraktion F über CM-Sephadex (s. Methoden, Abs. 18) wurde keine brauchbare Auftrennung erreicht. Die gewonnene Fraktion C wurde nach gemeinsamer und getrennter Inkubation mit Lipoproteinen ausgetestet. Sie war ähnlich wie die Ausgangsfraktion F enzymatisch aktiv. Da eine Anreicherung des Enzyms mittels dieser Methode auch nach Veränderung der angegebenen Versuchsbedingungen nicht möglich schien, wurden die Versuche eingestellt.

c. Wiederholung der Ammoniumsulfatfällung mit der Fraktion F

Die enzymhaltige Fraktion F wurde mit einer 3,6 M Ammoniumsulfatlösung so fraktioniert, daß ein Niederschlag A_1 bei 1,8 M, ein Niederschlag A_2 bei 2,2 M und ein weiterer Niederschlag A_3 bei 2,8 M erhalten wurde (s. Methoden, Abs. 12). Die Fraktionen wurden gemeinsam und getrennt mit Lipoproteinen inkubiert und auf ihre Inhibitorfreisetzung untersucht.

Fraktion (5 mg)	Inkubation mit (+) und ohne (-) LP	1/2-, 1 Stunden Senkungswert (mm)	Hemmung (%)
A_1	+	30 / 63	44
A_1	-	55 / 105	-
A_2	+	28 / 57	42
A_2	-	46 / 94	-
A_3	+	19 / 52	60
A_3	-	48 / 102	-

Tab. 7. Ammoniumsulfatfällung der Fraktion F. Suspensionslösung: 5 mg A_1, A_2 oder A_3 in 0,67 ml 0,9 %-iger Kochsalzlöung + 0,03 ml Lipoproteinfraktion (4-5 %) + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran.

Aus Tab. 7 geht hervor, daß enzymatische Aktivität in den Fraktionen A_1, A_2 und A_3 enthalten ist. Eine erneute Ammoniumsulfatfällung führt also zu keiner Anreicherung der enzymatischen Aktivität.

d. Auftrennung der Fraktion H_1 über Polyvinylchlorid-Elektrophorese

Die enzymhaltige Fraktion H_1 wurde mittels präparativer Elektrophorese an Polyvinylchlorid (PVC) aufgetrennt (s. Methoden, Abs. 20). Die bei der elektrophoretischen Auftrennung gewonnenen Fraktionen E_1 (Wanderungsgeschwindigkeit = 3,5-6,0 cm/20 Stunden), E_2 (Wanderungsgeschwindigkeit = 7-9 cm/20 Stunden) und E_3 (Wanderungsgeschwindigkeit = 10-12 cm/20 Stunden) wurden nach gemeinsamer und getrennter Inkubation mit Lipoproteinen auf ihre Inhibitorfreisetzung untersucht.

Fraktion (1,5 mg)	Inkubation mit (+) und ohne (-) LP	1/2-, 1 Stunden Senkungswert (mm)	Hemmung (%)
E_1	+	16 / 37	-
E_1	-	18 / 38	-
E_2	+	16 / 29	42
E_2	-	29 / 51	-
E_3	+	3 / 5	80
E_3	-	23 / 38	-

Tab. 8. Elektrophorese der Fraktion H_1 über Polyvinylchlorid. Suspensionslösung: 1,5 mg E_1, E_2 oder E_3 in 0,67 ml 0,9 %-iger Kochsalzlösung + 0,03 ml Lipoproteinfraktion (4-5 %) + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran.

Tab. 8 zeigt, daß sich die enzymatische Aktivität zum großen Teil in der Fraktion E_3 befindet, die im α_1-Bereich wandert.

e. Fällung mit organischen Lösungsmitteln und organischen Kationen

Um zu prüfen, ob sich organische Lösungsmitteln und organische Kationen zur weiteren Anreicherung des Enzyms eignen, wurde ein enzymhaltiges Präparat mit Alkohol, Aceton, Äther, Rivanol oder Surfen behandelt. Die erhaltenen Fraktionen wurden einzeln und in Kombination miteinander ausgetestet. Die Ergebnisse zeigten in allen Fällen, daß durch die beschriebenen Verfahren (s. Methoden, Abs. 19) die enzymatische Aktivität des Präparates stark herabgesetzt oder meistens ganz zerstört war.

13. Substratspezifität

Um zu prüfen, welche Lipoproteinfraktion den Proinhibitor enthält, wurden aus Mischserum mittels Ultrazentrifugation die Lipoproteine entsprechend ihrer Dichte gewonnen (s. Methoden, Abs. 13). Sie wurden nach gemeinsamer und getrennter Inkubation mit 10 mg Enzympräparat der Fraktion G (s. Versuch 9) im Senkungstest auf ihre Eignung als Substrat untersucht. Abb. 11 zeigt, daß aus den Lipoproteinen der Dichte D $\leq$1,019 g/ml (α_2-LP) kein Inhibitor freigesetzt wird. Folglich müssen Lipoproteine der Dichte D $\geq$ 1,019 g/ml den Proinhibitor enthalten. Die Auftrennung dieser Fraktion in Lipoproteine der Dichte D $\leq$1,063 g/ml (ß-LP) und solcher der Dichte D $\geq$1,063 g/ml (α_1-LP) ergibt, daß der Proinhibitor bei den Lipoproteinen der niedrigeren Dichte höher konzentriert vorliegt. Die Konzentration der verschiedenen Lipoproteinfraktionen im Senkungsansatz ist von wesentlicher Bedeutung. Eine Zunahme über ein Optimum hinaus führt zu einer Abnahme der Inhibitorfreisetzung, bis sie im Senkungstest nicht mehr nachweisbar ist. Die Lipoproteine der Dichte D>1,063 g/ml (α_1-LP) waren bei verschiedenen Aufarbeitungen als Substrat unterschiedlich geeignet. Es wurde aus ihnen aber unter sonst gleichen Bedingungen immer weniger Inhibitor freigesetzt als aus den ß-Lipoproteinen. Das Enzym reagiert nicht nur mit dem Proinhibitor der Lipoproteinfrak-

tion, es katalysiert auch die Inhibitorentstehung aus dünnschichtchromatographisch reinem Lecithin. Lecithin muß jedoch in der unphysiologisch hohen Konzentration von 1500 µg/ml eingesetzt werden, damit Inhibitor im Senkungstest nachgewiesen werden kann (56).

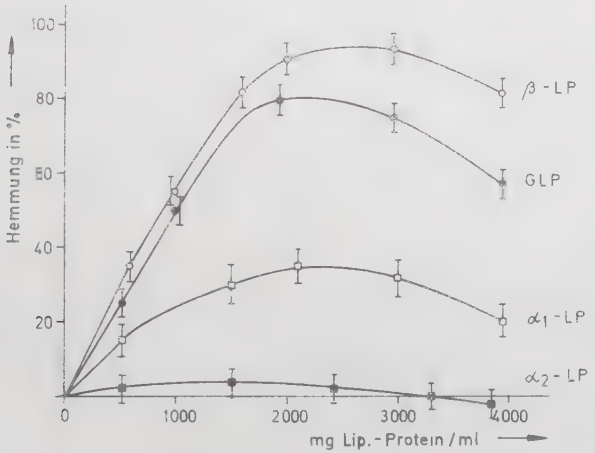


Abb. 11. Versuche zur Substratspezifität. Suspensionslösung: steigende Mengen Lipoprotein verschiedener Dichten (α_2-, ß-, α_1-Lipoproteine, Gesamtlipoproteinfraktion GLP) + 10 mg Protein der Fraktion G in 0,7 ml 0,9 %-iger Kochsalzlösung + 0,3 ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran.

■——■ Lipoproteine mit D $\leq$ 1,019 g/ml (α_2-LP);

o——o Lipoproteine mit D = 1,019 bis 1,063 g/ml (ß-LP);

□——□ Lipoproteine mit D $\geq$ 1,063 g/ml (α_1-LP);

●——● Gesamtlipoproteinfraktion (GLP).

Besprechung

Es wurde versucht, aus menschlichem Serum ein Lysolecithin freisetzendes Enzym anzureichern und teilweise zu charakterisieren.
Als Test wurde zur Bestimmung des freigesetzten Lysolecithins der Senkungstest verwandt. Den Vorteilen dieses Testes, die vor allem in der unkomplizierten Handhabung, in der Schnelligkeit der Durchführung und der Empfindlichkeit liegen, stehen erhebliche Nachteile gegenüber. Er wird beeinflußt durch Albumin, Agglomerine und freie Fettsäuren, die in den auszutestenden Fraktionen verschieden konzentriert vorhanden sein können: Albumin bildet mit dem Inhibitor Lysolecithin einen Komplex (22,23). Dadurch wird Lysolecithin, das mit der Erythrocytenoberfläche reagieren muß, um im Senkungstest die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit hemmen zu können, teilweise abgefangen, bevor es an die Erythrocyten-Rezeptoren gebunden wird. Agglomerine schränken die Hemmung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit durch den Inhibitor ebenfalls ein, da sie als senkungsbeschleunigende Proteine der Hemmung entgegenwirken. Dagegen ist die senkungshemmende Eigenschaft der freien Fettsäuren im Vergleich zu der von Lysolecithin von geringer Bedeutung (28), sodaß sie vernachläßigt werden kann.
Das Lysolecithin-freisetzende Enzym des Mischserums wird mittels Ammoniumsulfatfällung, Ultrazentrifugation bei erhöhter Dichte, Chromatographie über DEAE-Sephadex und Hydroxylapatit soweit angereichert, daß die spezifische Aktivität etwa 160 fach erhöht ist.

Tab. 9. Übersicht über die Anreicherung der enzymatischen Aktivität (s. Methoden, Abs. 8). Die Werte sind Durchschnittswerte aus mindestens 4 Versuchen.

Fraktion	Protein (mg)	Gesamtaktiv. (Enz. - Einheit)	Spezif. Aktivität (Enz.-Einh./mg)	Anreicherung	Ausbeute (%)
Mischserum	37 500	1250	0,0333	1	100
N_2	4 500	1000	0,222	6	80,0
U	3 000	330	0,11	3	26
F	450	300	0,665	20	24
H_1	53	280	5,3	160	22

Tab. 9 zeigt, daß durch die zur Trennung von Proinhibitor und Enzym notwendige Ultrazentrifugation zwischen den Fraktionen N_2 und U die spezifische Aktivität und besonders die Enzymausbeute stark herabgesetzt werden. Die spezifische enzymatische Aktivität nimmt im Zentrifugenröhrchen nach der Ultrazentrifugation von oben nach unten stark ab (Tab. 4 und Abb. 7). Sie ist mit Sicherheit in der Zwischenzone ZZ am höchsten (Tab. 3). Da die Zwischenzone, die neben Enzym auch Substrat enthält, verworfen werden mußte, weil zur weiteren Anreicherung des Enzyms eine Trennung des Hemmsystems erforderlich schien, ist der in Tab. 9 aufgezeigte Enzymverlust verständlich. Die mit Hilfe der Ultrazentrifugation bei erhöhter Dichte zu erreichende Trennung des Hemmsystems ist jedoch recht unvollständig, so daß das Vorliegen eines Enzym-Substrat-Komplexes, der bereits von Glomset (58)und von Chaikoff (59) postuliert wird, sehr wahrscheinlich ist. Ob aus der Zwischenzone ZZ dieser Komplex angereichert werden kann, wobei die Trennung des Komplexes und damit die Reindarstellung des Enzyms am Ende der Präparation durchzuführen wäre, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Im übrigen wurde die Aufarbeitung von Mischserum zur Anreicherung des Enzyms gegenüber früheren Versuchen in unserer Arbeitsgruppe (60) wesentlich verbessert:

1. Während früher Mischserum zur Trennung von Enzym und Substrat ultrazentrifugiert wurde, steht heute am Beginn der Präparation die Ammoniumsulfatfällung. Der Vorteil besteht darin, daß eine wesentlich größere Menge Mischserum in wesentlich kürzerer Zeit zu einem weitaus aktiveren Enzympräparat verarbeitet werden kann. Die gleichzeitig gewonnene Lipoproteinfraktion LP eignet sich als Substrat, obwohl in ihr ein Großteil der bekannten Lipoproteine vorkommt.
2. Die enzymhaltige Fraktion U wurde nicht wie früher über Sephadex G-200, sondern auch über DEAE-Sephadex A-40 chromatographiert. Dieser Schritt ermöglicht die Auftrennung großer Mengen und liefert ein Enzympräparat mit höherer spezifischer Aktivität.
3. Das über DEAE-Sephadex gewonnene Enzympräparat F wird weiter mittels Chromatographie über Hydroxylapatit gereinigt.
4. Die früher zum Salzaustausch angewandte vielstündige Dialyse der Fraktionen N_2 und U führte in vielen Fällen zu einer Herabsetzung der spezifischen enzymatischen Aktivität. Durch den Salzaustausch mittels Gelfiltration über Sephadex G-25 wird dieser Nachteil aufgrund der erheblichen zeitlichen Verkürzung des Präparationsganges vermieden.

Die Eigenschaften des hier beschriebenen Lysolecithin-freisetzenden Enzyms sind nur teilweise bekannt:

1. Durch 10 Minuten dauerndes Erhitzen auf 57° wird das Enzym inaktiviert.
2. Elektrophoretisch wandert es mit den α_1-Globulinen.
3. Sein pH-Optimum liegt im schwach alkalischen Bereich.
4. Durch SH-Gruppenblocker (p/hydroxymercuribenzoat, Jodacetamid (61) und Esterasehemmer (Diisopropylfluorophosphat und Physostigmin (27)) wird die Inhibitorfreisetzung unterdrückt. Dasselbe geschieht auch durch Schwermetallionen (27) und Harnstoff, dessen Blockade aber reversibel ist.

5. Es scheint eine hohe Affinität zu den Lipoproteinen zu besitzen, sodaß ein Lipoprotein-Enzym-Komplex anzunehmen ist.
6. Als Substrat eigneten sich vor allem Lipoproteine mittlerer Dichte. Immunelektrophoretisch handelte es sich um ß-Lipoproteine, die geringfügig mit α_1-Lipoproteinen verunreinigt waren. Aber auch aus Lipoproteinen höherer Dichte wurde, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß, Inhibitor freigesetzt. Immunelektrophoretisch wurden hierbei α_1-Lipoproteine und eine schwache Bande von ß-Lipoproteinen nachgewiesen. In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (20) war dagegen eine Substrataktivität nur bei den α_1-Lipoproteinen gefunden worden. Eine Erklärung dieser unterschiedlichen Ergebnisse steht noch aus. Auch aus einem chromatographisch reinen Lecithinpräparat wird die Lysoverbindung freigesetzt, wobei jedoch die Substratkonzentration, auf Lecithin bezogen, um 1-2 Zehnerpotenzen höher sein muß als bei der Lipoproteinfraktion. Dies stimmt mit Untersuchungen an einer aus Pankreas gewonnenen Phospholipase A über, für die ebenfalls Lipoproteine als Substrat besser geeignet sind als reine Phosphatide (62).
7. Das Ergebnis der Gelfiltration spricht für ein Molekulargewicht des Enzyms zwischen dem des Albumins (MG = 69 000) und dem des Coeruloplasmins (MG = 160 000).
8. Wie die zahlreichen erfolglos angewandten Methoden zur weiteren Anreicherung zeigen, handelt es sich um ein Enzym von großer Labilität.

Wie schon ausgeführt, hat der Senkungstest zahlreiche Nachteile, sodaß es notwendig sein wird, zur Ausschaltung der genannten Fehlerquellen in Zukunft das freigesetzte Lysolecithin trotz der Aufwendigkeit der Methode auf chemischem Wege zu bestimmen. Dieser Test erlaubt eine gleichzeitige Bestimmung der Lecithinabnahme, die zur Beurteilung der enzymatischen Aktivität möglicherweise günstiger ist als die Bestimmung der Lysolecithinfreisetzung, da Lysolecithin während der Inkubation im Serum weiter zu Glycerylphosphorylcholin und Cholin abgebaut werden kann (57).

In den letzten Jahren wurden im menschlichen Serum enzymatische Aktivitäten gefunden, die Lysolecithin als Reaktionsprodukt liefern und möglicherweise mit dem hier beschriebenen Lysolecithin freisetzenden Enzym in Beziehung stehen:

I. Glomset (58) gelang die Anreicherung einer Cholesterinacyltransferase aus menschlichem Plasma. Die Acyltransferase spaltet eine Fettsäure in ß-Position vom Lecithin ab und überträgt diese auf Cholesterin. Reaktionsprodukt ist Lysolecithin und ein Cholesterinester. Substrate sind ebenfalls Phosphatide der Lipoproteine. Für eine Identität sprechen, daß 1. das Enzym bei der Ammoniumsulfatfällung im selben Sättigungsbereich ausfällt, daß 2. es dem Ergebnis der Gelfiltration über Sephadex G-200 entsprechend ein ähnliches Molekulargewicht besitzt, 3. daß es mit Phosphat-Puffer fast derselben Ionenstärke von der Hydroxylapatitsäule eluiert wird, 4. daß es bei der Polyacrylamidelektrophorese im α_1-Bereich wandert, 5. daß es mit Lipoproteinen einen Komplex bildet und 6. daß sein Wirkungsoptimum zwischen pH 7,5 und 8,5 liegt.
Gegen eine Identität spricht lediglich, daß die Acyltransferase von Glomset im Gegensatz zu dem hier beschriebenen Enzym durch Harnstoff irreversibel gehemmt wird. Es müßte untersucht werden, ob das hier beschriebene Enzym auch eine Acylierung des Cholesterins verursacht, und diese Eigenschaft vielleicht isoliert durch Harnstoff gehemmt wird, um Genaueres über eine Identität der beiden Enzyme sagen zu können.

II. Shah, Lossow und Chaikoff (59) bestätigten Glomset, daß die Veresterung von Cholesterin durch eine Fettsäuretransferase erfolgt. Zur Cholesterinveresterung dienen Fettsäuren der ß-Position von Phospholipiden. Mittels Ultrazentrifugation bei erhöhter Dichte reicherten sie bedeutende enzymatische Aktivität in der Lipoproteinfraktion hoher Dichte an (63).

III. Götze und Fischer (64) gewannen eine Serumfraktion, die bei der Immunhämolyse die Auflösung roter Blutkörperchen verursacht, vorausgesetzt, daß die Komplementfaktoren C'1 - C'7 vorhanden sind. Diese Fraktion besitzt mit großer Wahrschein-

lichkeit Lecithinaseeigenschaft. Reaktionsprodukt ist ebenfalls Lysolecithin. Die enzymatische Aktivität ist durch das hier beschriebene Enzym zu ersetzen (65), umgekehrt zeigte sich, daß eine aktive Fraktion von Götze und Fischer mit unserem Substrat gemeinsam und getrennt inkubiert im Senkungstest keine Inhibitorfreisetzung verursachte.

Die biologische Bedeutung des Proinhibitor-Enzym-Systems ist unklar. Daß es im Serum oder Plasma in vivo nicht zur Lysolecithinanreicherung kommt, ist wohl darauf zurückzuführen, daß Lysolecithin rasch aus dem Blutkreislauf entfernt wird (66). Dies kann geschehen, indem Lysolecithin im Serum weiter zu Glycerylphosphorylcholin abgebaut wird (57) oder indem es nach Bindung an Erythrocyten zu Lecithin acyliert wird (67,68).

Von medizinischem Interesse dürfte die Beobachtung sein, daß das beschriebene Hemmsystem bei Patienten mit einer beschleunigten Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit wegen eines Malignoms im statistischen Durchschnitt deutlich schwächer wirksam ist als bei Patienten mit einer beschleunigten Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit aufgrund einer Entzündungskrankheit (69,70). Ähnlich verdient die Tatsache Beachtung, daß der Lysolecithingehalt des Serums bei Tay-Sachsscher-, Spielmayer-Vogtscher- und Niemann-Pickscher Erkrankung gegenüber Normalseren (71) erhöht ist. Diese Befunde könnten unter anderem mit einer erhöhten Aktivität des hier beschriebenen Enzyms erklärt werden.

Zusammenfassung

1. Während einer mehrstündigen Inkubation von menschlichem Serum bei 37° wird aus einem Proinhibitor, der zur Lipoproteinfraktion gehört, der Senkungsinhibitor Lysolecithin freigesetzt.

2. Die Lysolecithinentstehung erfolgt auf enzymatischem Wege, das pH-Optimum der Reaktion liegt im schwach alkalischen Bereich. Harnstoff und p-Hydroxymercuri-benzoat hemmen die Reaktion reversibel.

3. Das Proinhibitor-Enzym-System läßt sich durch Ammoniumsulfatfällung anreichern und mittels Ultrazentrifugation bei erhöhter Dichte (D = 1,205 g/ml) lassen sich Enzym und Substrat trennen: das Substrat befindet sich im Flotationsprodukt, das Enzym im Unterstand.

4. Chromatographie des enzymhaltigen Unterstandes über DEAE-Sephadex und Hydroxylapatit führen zu einer etwa 160fachen Anreicherung des Enzyms. Eine weitere Reinigung scheiterte vorerst an seiner Labilität.

5. Das Molekulargewicht des Enzyms liegt zwischen dem des Albumins (MG = 69 000) und dem des Coeruloplasmins (MG = 160 000). Elektrophoretisch wandert es im α_1-Bereich. Durch 10-minütiges Erhitzen auf 57° wird es inaktiviert.

6. Als Substrat eignen sich die Lipoproteine der Dichte D > 1,019 g/ml, wobei die Lipoproteine zwischen den Dichten 1,019 g/ml und 1,063 g/ml die größte Menge Proinhibitor zu enthalten scheinen. Auch aus dünnschichtchromatographisch reinem Lecithin wird die Lysoverbindung freigesetzt; dessen Konzentration muß jedoch, auf den Lecithingehalt der Lipoproteine bezogen, um eine bis zwei Zehnerpotenzen höher sein als jene bei der Austestung von Lipoproteinen.

Literaturverzeichnis

1) Nasse, H.: Das Blut in mehrfacher Beziehung physiol. u. pathol. untersucht, Bonn (1836)

2) Hewson: Works ed. Gulliver, London (1846)

3) Fåhraeus, R.: Acta med. scand. 55, 1 (1921)

4) Fåhraeus, R.: Biochem. Ztschr. 89, 355 (1918)

5) Ruhenstroth-Bauer, G.: Acta haemat. 18, 98 (1957)

6) Gordon, C.M., Wardley, J.R.: Biochem. J. 37, 393 (1943)

7) Ruhenstroth-Bauer, G., Kayser, F.H., Nass, G., Tautfest, M.: Klin. Wschr. 40, 1200 (1962)

8) Ruhenstroth-Bauer, G.: Klin. Wschr. 43, 460 (1965)

9) Nass, G.: Dissertation, München 1960

10) Linzenmeyer, G.: Pflügers Arch.f.ges.Physiol.181,169 (1920)

11) Wunderly, Ch., Wuhrmann, F.: Schweiz.med.Wschr.74,1128 (1945)

12) Schubert, R., Wiegandt, E.: Dtsch.med.Wschr. 70, 107 (1944)

13) Schmidt, G.: Ztschr. Immunitätsforsch. 107, 341 (1950)

14) Linzenmeyer, G.: Pflügers Arch.f.ges.Physiol.186,272 (1921)

15) Meyer, K., Hahnel, E., Feiner, R.R.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 58, 36 (1945)

16) Hummel, K.: Zbl. Bakt. I. Abt. Org. 157, 176 (1951)

17) Bergenhem, B., Fåhraeus, R.: Z. ges.exp.Med. 97, 535 (1936)

18) Schiebel, W., Ruhenstroth-Bauer, G.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 348, 27 (1967)

19) Fischer, H., Ferber, E.: priv. Mitteilung (1965)

20) Kayser, F.H., Nass, G., Ruhenstroth-Bauer, G.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 331, 95 (1963)

21) Ruhenstroth-Bauer, G.: Blut 5, 91 (1959)

22) Schiebel, W., Nass, G., Eulitz, M., Ruhenstroth-Bauer,G.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 338, 198 (1964)

23) Switzer, S., Eder, H.A.: J. Lipid Res. 6, 506 (1965)

24) Klibansky, C., DeVries, A.: Biochem. biophys. Acta (Amsterdam) 70, 176 (1963)

25) Reman, F.C., Van Deenen, L.L.M.: Biochem. biophys. Acta (Amsterdam) 137, 592 (1967)

26) Bergenhem, B.: Acta pathol. microbiol. scand., Suppl. 39, 220 (1939)

27) Ruhenstroth-Bauer, G.: Proc. VIII. Intern. Congr. Hematol., Tokyo 1960, Pan Pacific Press, Tokyo (1960).

28) Ehrly, A.M., Müller, H.E.: Klin. Wschr. 43, 943 (1965)

29) Bendien, W.M., Neuberg, I., Snapper, I.: Biochem. Ztschr. 247, 307 (1932)

30) Lichty, J.A., Hooker, S.P.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 48, 69 (1941)

31) Ruhenstroth-Bauer, G., Brittinger, G., Granzer, E., Nass,G.: Dtsch. med. Wschr. 85, 808 (1960)

32) Martin, E., Scheidegger, J.J.: Helv. med. Acta 19, 465 (1952)

33) Ruhenstroth-Bauer, G.: Klin. Wschr. 44, 533 (1966)

34) Westergren, A.: Ergebn. inn. Med. 26, 577 (1924)

35) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: J. biol. Chemistry 193, 265 (1951)

36) Taylor, J.F., Neurath, H.N.: The Proteins I, S. 55 (1953)

37) Flodin, P.: J. Chromatogr. (Amsterdam) 5, 103 (1961)

38) De Lalla, O.F., Gofman, J.W.: Methods biochem. Analysis 1, 459 (1954)

39) Korn, E.D.: Methods biochem. Analysis 7, 145 (1959)

40) Freeman, N.K.: Progr. Chem. Fats other Lipids 6, 251 (1963)

41) Lindgreen, F.T., Nichols, A.V., Putnam, F.W.: Plasma Proteins, Bd. II, S. 4, Academic Press, New York (1960)

42) Oncley, J.L., Gurd, F.R.N., Melin, M.: J. Amer. chem. Soc. 72, 458 (1950)

43) Flodin, P., Killander, J.: Biochim. biophys. Acta (Amsterdam) 63, 403 (1962)

44) Gelotte, B., Flodin, P., Killander, J.: Arch. Biochem. Biophys., Suppl. 1, 319 (1962)

45) Anacker, W.F., Stoy, V.: Biochem. Z. 330, 141 (1958)

46) Levin, O., Colowick, S.P., Kaplan, N.O: Methods in Enzymol. 5, 27 (1962)

47) Pharmacia (Uppsala-Schweden) über "Sephadex Ionenaustauscher" (1967)

48) Cohn, E.J., Strong, L.E., Hughes, W.L., Mulford, D.J., Ashworth, J.N., Melin, M., Taylor, H.L.: J. Amer. chem. Soc. 68, 459 (1946)

49) Kekwick, R.A., Mackay, M.E.: Med. Res. Council, Spec. Rep. Ser. 286, 75 (1954)

50) Askonas, R.A.: Biochem. J. 48, 42 (1951)

51) Heide, K., Haupt, H.: Behringwerk-Mitt., 43, 161 (1964)

52) Knedel, M.: Habilitationsschrift München (1960)

53) Heimburger, N., Schmidtberger, R.: Behringwerk-Mitt. Heft 43 (1964)

54) Grabar, P., Williams, G.A.: Biochim. biophys. Acta (Amsterdam) 10, 193 (1953)

55) Scheidegger, J.J.: Int. Arch. Allergy appl. Immunol. 7, 103 (1955)

56) Adlkofer, F., Birkhofer, G., Ruhenstroth-Bauer, G.: in Vorb.

57) Mulder, E., van den Berg, J.W., van Deenen, L.L.M.: Biochim. biophys. Acta (Amsterdam) 106, 118 (1965)

58) Glomset, J.A., Wright, J.L.: Biochim. biophys. Acta (Amsterdam) 89, 266 (1964)

59) Shah, S.N, Lossow, W.J., Chaikoff, I.L.: Biochim. biophys. Acta (Amsterdam) 84, 176 (1964)

60) Adlkofer, F.: Dissertation, München (1966)

61) Schiebel, W., Adlkofer, F.: unveröffentlichte Ergebnisse

62) Ibrahim, S.A., Hazel Sanders, Thompson, R.: Biochem. J. 93, 588 (1964)

63) Lossow, W.J., Shah, S.N., Chaikoff, I.L.: Biochim. biophys. Acta (Amsterdam) 116, 172 (1966)

64) Götze, O., Fischer, H.: Z. klin. Chem. 3, 202 (1965)

65) Fischer, H.: persönl. Mitteilung

66) Klibansky, Ch., Condrea, E., de Vries, A.: Amer. J. Physiol. 203, 114 (1962)

67) Oliveira, M.M., Vaughan, M.: Fed. Proc. 11, 296 (1962)

68) Robertson, A.F., Lands, W.E.: J. Lipid Res. 5, 88 (1964)

69) Ruhenstroth-Bauer, G.: Hippokrates 21, 829 (1961)

70) Gross, R., Gerhard, W., Rassner, G.: Dtsch. med. Wschr. 91, 1869 (1966)

71) Spiegel-Adolf, M., Baird, H.W., Novotny, A., McCafferty, M.: Fed. Proc. 26, 846 (1967)

Lebenslauf

Am 24. März 1943 wurde ich in München als Tochter des Rechtsanwalts Edinger Ancker und seiner Frau Eleonora, geb. Walraven, geboren.

Ich besuchte die Volksschule in Tönning a.d. Eider und in Düsseldorf, das Neusprachliche Mädchengymnasium in Düsseldorf, wo ich im März 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1963 begann ich an der Universität München Medizin zu studieren. Dort bestand ich im Juli 1965 das Physikum. Zur Zeit stehe ich im medizinischen Staatsexamen.

Von Oktober 1965 bis März 1968 arbeitete ich im Max-Planck-Institut für Biochemie in München an meiner Doktorarbeit.